

苦豆子生物碱对小菜蛾体内部分杀虫剂 代谢酶活性的影响

罗万春, 张 强*

(山东农业大学农药毒理与应用技术省级重点实验室, 泰安, 山东 271018)

摘要: 以苦豆子 *Sophora alopecuroids* 7 种生物碱和小菜蛾 *Plutella xylostella* 幼虫为试材, 研究了该生物碱对小菜蛾体内降解杀虫剂的羧酸酯酶、磷酸酯酶、谷胱甘肽-S-转移酶活性的影响。结果表明: 野靛碱和苦豆碱对羧酸酯酶活性有显著的抑制, 为可逆抑制类型的非竞争性抑制作用; 野靛碱等 5 种生物碱对酸性磷酸酯酶有明显的抑制, 野靛碱对碱性磷酸酯酶有弱抑制作用; 其中野靛碱等 3 种生物碱对谷胱甘肽-S-转移酶有明显的抑制作用。

关键词: 苦豆子; 生物碱; 杀虫剂; 代谢酶; 小菜蛾

中图分类号: Q965.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296 (2003) 01-0112-04

The effects of *Sophora alopecuroids* alkaloids on metabolic esterases of the diamond-back moth

LUO Wan-Chun, ZHANG Qiang* (Shandong Key Laboratory of Pesticide Toxicology and Application Technique, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China)

Abstract: The effects of seven alkaloids from *Sophora alopecuroids*, a leguminous plant, on metabolic esterases of the larvae of the diamondback moth *Plutella xylostella* (L.) were studied. The results indicate that cytisine and aloperine could inhibit carboxylesterase activity through non-competitive inhibition. Sophoramine, sophoradine, matrine, oxymatrine and cytisine could inhibit the activity of acid phosphoresterase, and cytisine could also weakly inhibit the activity of alkaline phosphoresterase. In addition, three alkaloids, cytisine, sophoramine and sophocarpine could inhibit the activity of glutathione-s-transferase in diamondback moth larvae.

Key words: *Sophora alopecuroids*; alkaloids; pesticide; metabolic esterase; *Plutella xylostella*

杀虫剂降解酶在昆虫对杀虫剂的抗药性中起着极其重要的作用。植物中广泛存在的次生代谢物质常能导致这类酶系活性的增强或降低, 致使采用有机合成杀虫剂在防治害虫时, 造成截然不同的防治效果 (Klocke, 1987; 高希武等, 1997)。苦豆子 *Sophora alopecuroids* 为豆科槐属植物, 广泛分布于我国西北地区, 已从该植物中分离鉴定了 20 余种生物碱, 并证明了多种苦豆子生物碱的药理作用和医药用途 (周立华, 1979; Kuchkarov and Kushmuradov, 1979; 赵博光和刘秀华, 1984; 李雪梅, 1984; 刘国卿和袁惠南, 1987)。作者以小菜蛾 *Plutella xylostella* 为试虫, 研究了以野靛碱等为主的 7 种苦豆子次生代谢物质—生物碱对小菜蛾体内部分杀虫剂降解酶活性的影响, 以便为研究开发这

类植物次生代谢物质提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

供试昆虫为小菜蛾幼虫, 在养虫室 (温度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 湿度 70%, 光照 14 h, 黑暗 10 h), 用改良的蛭石白菜苗法饲养, 饲养植物为大白菜 *Brassica campestris* 苗。

1.2 供试生物碱

本试验所用野靛碱 (纯度 96%)、苦豆碱 (96%)、槐定碱 (95%)、槐胺碱 (97%)、槐果碱 (93%)、苦参碱 (98%) 和氧化苦参碱 (97%) 均由苦豆子中提取分离制备, 由宁夏盐池三鑫生物技

基金项目: 山东省教育厅基金资助项目 (J00E15)

作者简介: 罗万春, 1951 年生, 河北定州人, 博士, 教授, 主要从事昆虫毒理学和无公害农药研究, E-mail: wehuo@sdau.edu.cn

* 现在天津市农药检定所工作

收稿日期 Received: 2001-08-26; 接受日期 Accepted: 2001-12-24

术开发有限公司提供。

1.3 主要仪器及试剂

试验使用的主要仪器：高速冷冻离心机，日本日立公司；岛津 UV-2201 紫外分光光度计，日本岛津公司；电动恒温水浴摇床，上海华光仪器公司。使用主要试剂为：1-氯-2,4-二硝基苯（CDNB）、还原型谷胱甘肽（GSH）、十二烷基硫酸钠（SDS）均为 Sigma 公司产品，中国医药公司分装； α -乙酸萘酯（ α -NA）为上海试剂一厂产品，坚固蓝 B 盐为 Fluka 公司产品；硫酸毒扁豆碱、 α -萘酚、对-硝基酚、对硝基苯磷酸二钠、EDTA 均由国内有关厂家生产或从国内代理公司购买，均为分析纯产品。

1.4 测定方法

1.4.1 酶源制备：将小菜蛾 4 龄幼虫置于 0.1 mol/L pH 7.0 的磷酸缓冲液中，在冰浴中匀浆，匀浆液用 CR22 型冷冻离心机（4 000 r/min，恒温 4℃）离心 20 min，取上清液作酶源。

1.4.2 蛋白质浓度测定：采用考马斯亮蓝法（Bradford, 1976）。

1.4.3 酶活力测定：羧酸酯酶活性测定：参照 Asperene（1962）的方法。以 α -乙酸萘酯为底物，在 30℃，pH 7.0 条件下，经水解生成 α -萘酚， α -萘酚与显色剂坚固兰 B 生成蓝紫色。将 6 mL 酶与底物混合物于 25℃ 恒温水浴中反应 30 min 后加入显色剂 [1% 坚固兰 B 与 5% 十二烷基硫酸钠（2:5）] 1 mL 显色，并同时终止反应，用 UV-2201 型紫外分光光度计于 600 nm 处测定其 OD 值。每处理重复 3 次。

磷酸酯酶活性测定：采用 Bessey（1964）提出的方法。以对-硝基磷酸二钠为底物，在 30℃ 下经磷酸酯酶水解生成对-硝基苯酚，对-硝基苯酚在碱性条件下呈黄色，用 UV2201 型紫外分光光度计于 400 nm 处测定其 OD 值。其中酸性磷酸酯酶测定工作缓冲液为 0.2 mol/L pH 4.6 醋酸缓冲液，碱性磷酸酯酶测定用工作缓冲液为 0.04 mol/L pH 9.6 巴比妥钠—盐酸缓冲液。

谷胱甘肽-S-转移酶活性测定：采用 Brooth 等（1973）提出并经修改的 CDNB 法。以 CDNB（1-氯 2,4-二硝基苯）为底物，在酶催化下与 GSH 生成 GSH-S-芳基复合物，在 340 nm 处测定 OD 值。工作缓冲液为 0.1 mol/L pH 7.0 磷酸缓冲液，内含 0.12 mmol/L EDTA（乙二胺四乙酸）。

1.4.4 酶动力学性质测定：测定 5 个以上不同底物浓度下的酶反应初速度，用 Lineweaver-Burk 作图

法求 K_m 和 V_{max} 值。

2 结果与分析

2.1 苦豆子 7 种生物碱对羧酸酯酶活性的影响

2.1.1 苦豆子 7 种生物碱对羧酸酯酶比活力的影响：由表 1 得知，苦豆子 7 种生物碱中，以野靛碱和苦豆碱对羧酸酯酶比活力的抑制程度最高，特别以野靛碱为甚。未加生物碱对照组羧酸酯酶的比活力为 274.94 $\mu\text{M}/\text{mg Pr}\cdot 30\text{ min}$ ，而加入野靛碱和苦豆碱处理组羧酸酯酶比活力仅为 35.16 $\mu\text{M}/\text{mg Pr}\cdot 30\text{ min}$ 和 166.71 $\mu\text{M}/\text{mg Pr}\cdot 30\text{ min}$ ，分别为对照组的 0.13 倍和 0.61 倍。与此相同，其它 5 种供试生物碱体外试验对羧酸酯酶的比活力也都有不同程度的抑制，酶活力分别为对照组的 0.7~0.9 倍。

表 1 苦豆子 7 种生物碱对小菜蛾幼虫羧酸酯酶比活力的影响
Table 1 Effects of *Sophora alopecuroids* alkaloids on CarE activity in *Phutella xylostella* larvae

生物碱 Alkaloids	羧酸酯酶比活力 CarE activities ($\mu\text{M}/\text{mg Pr}\cdot 30\text{ min}$) $\pm$ SE	比值 Ratio
槐胺碱 sophoramin	247.08 $\pm$ 7.47 b	0.90
野靛碱 cytisin	35.16 $\pm$ 4.32 f	0.13
苦参碱 matrine	234.18 $\pm$ 2.89 c	0.85
氧化苦参碱 oxymatrine	236.35 $\pm$ 8.51 c	0.86
槐定碱 sophoradine	202.95 $\pm$ 3.44 d	0.74
苦豆碱 aloperine	166.71 $\pm$ 3.58 e	0.61
槐果碱 sophocarpine	232.35 $\pm$ 4.06 c	0.85
对照 control	274.94 $\pm$ 1.92 a	1

注：试验重复 3 次，每次重复制备酶液。表中每列数据后标不同字母者，示方差分析在 $F_{0.05}$ 水平上差异显著。下同。Experiments were replicated three times. Means followed by the same letters in the same column indicate that values do not differ significantly ($P = 0.05$). The same below

2.1.2 野靛碱和苦豆碱对羧酸酯酶 K_m 和 V_{max} 的影响：基于野靛碱和苦豆碱对羧酸酯酶表现出了良好的抑制作用，作者对此两种生物碱对该酶的抑制作用进行了动力学研究。表 2 给出了野靛碱和苦豆碱不同加入量对羧酸酯酶米氏常数 K_m 及最大反应速度 V_{max} 的影响。从中可以看出，加入野靛碱和苦豆碱与否及生物碱加入量的不同对羧酸酯酶的米氏常数 K_m 的影响不大，各处理 K_m 值均在 0.18 $\mu\text{M}\cdot\text{L}^{-1}$ 左右。但野靛碱和苦豆碱对羧酸酯酶最大反应速度 V_{max} 影响显著，当野靛碱的添加量为 0.06 mg/mL

时, 羧酸酯酶的 $V_{\max}$ 可降低至原来的 0.24 倍; 当苦豆碱的添加量为 0.144 mg/mL 时, 羧酸酯酶的 $V_{\max}$ 可降低至原来的 0.57 倍。说明野靛碱和苦豆碱对羧酸酯酶活性的抑制可能为可逆抑制, 属非竞争性抑制, 即野靛碱和苦豆碱均为羧酸酯酶的非竞争性抑制剂, 但以野靛碱的抑制活性较强。

2.2 苦豆子 7 种生物碱对磷酸酯酶比活力的影响

从表 3 可见, 除苦豆碱和槐果碱外, 其它 5 种供试生物碱对酸性磷酸酯酶都有一定的抑制作用, 加入野靛碱等 5 种生物碱后, 酸性磷酸酯酶的比活力仅为对照组酶活力的 0.46 ~ 0.54 倍。从表中还可以看出, 除野靛碱对碱性磷酸酯酶的比活力有弱

的抑制作用外, 其它 6 种生物碱对该酶的活性均无明显影响, 此外, 苦豆碱和苦参碱不但不对该酶表现抑制, 反而对其活性有促进作用。

2.3 苦豆子生物碱对谷胱甘肽-S-转移酶活性的影响

由表 4 结果可知, 野靛碱、槐果碱和槐胺碱对谷胱甘肽-S-转移酶有弱抑制作用, 加入此 3 种生物碱处理后谷胱甘肽-S-转移酶比活力分别为 0.8543、0.8251 和 0.8639 OD•mg⁻¹•pr⁻¹•min⁻¹, 分别是未加生物碱对照组酶活力的 0.76 倍、0.74 倍和 0.78 倍, 其它 4 种生物碱对谷胱甘肽-S-转移酶均无明显的抑制作用。

表 2 不同浓度的野靛碱和苦豆碱对小菜蛾幼虫羧酸酯酶 K_m 及 $V_{\max}$ 的影响
Table 2 Effects of *Sophora alopecuroids* alkaloids on K_m and $V_{\max}$ of CarE in *Plutella xylostella* larvae

生物碱添加量 Volume of alkaloids (mg/mL)	K_m (μ M/L) $\pm$ SE	相对对照倍数 Ratio	$V_{\max}$ (μ M/mg Pr•30 min) $\pm$ SE	相对对照倍数 Ratio
野靛碱 cytisin				
0	0.182 $\pm$ 0.006	—	359.57 $\pm$ 3	—
0.015	0.164 $\pm$ 0.004	0.90	188.86 $\pm$ 1	0.53
0.030	0.189 $\pm$ 0.002	1.04	143.48 $\pm$ 1	0.40
0.060	0.183 $\pm$ 0.002	1.018	7.72 $\pm$ 0.7	0.24
苦豆碱 aloperine				
0	0.182 $\pm$ 0.003	—	359.57 $\pm$ 4	—
0.036	0.203 $\pm$ 0.007	1.12	266.06 $\pm$ 3	0.74
0.072	0.163 $\pm$ 0.006	0.90	226.63 $\pm$ 2	0.63
0.144	0.204 $\pm$ 0.003	1.12	206.18 $\pm$ 3	0.57

表 3 苦豆子 7 种生物碱对小菜蛾幼虫磷酸酯酶活性的影响
Table 3 Effects of *Sophora alopecuroids* alkaloids on phosphatase activity in *Plutella xylostella* larvae

生物碱 Alkaloids	酸性磷酸酯酶 Acid phosphatase		碱性磷酸酯酶 Alkaline phosphatase	
	比活力 Activities	活力比值	比活力 Activities	活力比值
	(mM/mg Pr•30 min) $\pm$ SE	Ratio	(mM/mg Pr•30 min) $\pm$ SE	Ratio
槐胺碱 sophoramine	9.71 $\pm$ 0.08 b	0.46	11.78 $\pm$ 0.06 b	0.91
野靛碱 cytisine	10.28 $\pm$ 0.09 b	0.48	10.25 $\pm$ 0.04 c	0.78
苦参碱 matrine	10.77 $\pm$ 0.07 b	0.51	17.24 $\pm$ 0.13 a	1.32
氧化苦参碱 oxymatrine	11.56 $\pm$ 0.10 b	0.54	12.00 $\pm$ 0.16 b	0.92
槐定碱 sophoradine	10.97 $\pm$ 0.13 b	0.52	13.12 $\pm$ 0.09 b	1.01
苦豆碱 aloperine	21.81 $\pm$ 0.09 a	1.04	18.77 $\pm$ 0.12 a	1.44
槐果碱 sophocarpine	24.60 $\pm$ 0.14 a	1.17	12.00 $\pm$ 0.07 b	0.92
对照 control	21.02 $\pm$ 0.05 a	1	13.03 $\pm$ 0.06 b	1

表4 苦豆子7种生物碱对小菜蛾幼虫谷胱甘肽-S-转移酶活性的影响

Table 4 Effects of *Sophora alopecuroids* alkaloids on GSTase activity in *Plutella xylostella* larvae

生物碱 Alkaloids	谷胱甘肽-S-转移酶比活力 GSTase activities (OD/mg Pr·min) ± SE	活力比值 Ratio
槐胺碱 sophoramine	0.8689 ± 0.006 c	0.78
野靛碱 cytisine	0.8543 ± 0.004 c	0.76
苦参碱 matrine	1.1147 ± 0.006 a	1.00
氧化苦参碱 oxymatrine	1.2091 ± 0.007 a	1.09
槐定碱 sophoradine	1.1767 ± 0.010 a	1.06
苦豆碱 aloperine	1.0337 ± 0.009 b	0.92
槐果碱 sophocarpine	0.8251 ± 0.004 c	0.74
对照 control	1.1133 ± 0.002 a	1

3 讨论

面对有机合成杀虫剂暴露出来的种种问题，人们逐渐把未来农药研制和开发的目光转向了天然产物。植物中的众多次生代谢物质是新一代农药研究的宝库。Waller 和 Nowacki（1987）在他们主编的专著中强调“植物他感化合物在栽培和自然生态系统中扮演的重要角色越来越被人们所认识”。

由于不同植物体内次生代谢产物的不同，常导致同一种害虫在不同寄主植物上对同一种杀虫剂的敏感性显著不同，致使采用同一药剂防治不同植物上的相同害虫时造成截然不同的防治效果（Waller and Nowacki, 1987；李云寿等, 1996）。许多研究指出，某些植物的次生代谢物质如 MDP（methylenedioxyphenyl）是使某些杀虫剂增效的原因，因为 MPD 是熟知的能抑制 MFO 活性的增效剂（Klocke, 1987）。另外的一种植物次生代谢物栲皮黄酮（3', 4', 3, 5, 7-五羟基黄酮）能抑制谷胱甘肽-S-转移酶的活性而起到对杀虫剂的增效作用（Metcalf and Metcalf, 1991）。罗万春等（1997）报道了苦豆子生物碱对萝卜蚜的生物活性并发现了野靛碱对几种酯酶活性的抑制作用，但未对野靛碱对羧酸酯酶的抑制动力学进行研究。本研究明确了苦豆子体内产生的次生代谢物如野靛碱等能不同程度地抑制昆虫体内羧酸酯酶、磷酸酯酶、谷胱甘肽-S-转移酶的活性，这对了解这类生物碱的杀虫机理有一定意义。

参 考 文 献（References）

Asperen K V A, 1962. Study of housefly esterase by mean of sensitive colorimetric method. *J. Ins. Physiol.*, 8: 321 – 329.
Bessey O A, 1964. A method for the rapid determination of phosphatase with

five cubic millimeters of serum. *J. Biol. Chem.*, 164: 321 – 329.
Brooth J, Conner M J, Meteaulf R A, Larsen J R, 1973. A comparative study of the effect of selective inhibitors on esterase from the mosquito *Aopheles punetipennis*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 44B: 1 185 – 1 195.
Bradford M M, 1976. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantilies of protein utilizing the principle of protein binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248 – 254.
Gao X W, Dong X L, Zheng B Z, Chen Q, 1997. Glutathione-s-transferase (GSTs) of *Helicoverpa armigera*: Induction of insecticides and plant allelochemicals and metabolism of insecticides. *Acta Entomol. Sin.*, 40 (2): 122 – 127. [高希武, 董向丽, 郑炳宗, 陈青, 1997. 棉铃虫的谷胱甘肽-S-转移酶 (GSTs): 杀虫药剂和植物次生物质的诱导与 GSTs 对杀虫药剂的代谢. 昆虫学报, 40 (2): 122 – 127]
Klocke J A, 1987. Natural plant compounds useful in insect control. In: Waller G R ed. Allelochemicals-role in Agriculture and Forestry. Am. Chem. Soc., Washington DC. 397.
Kuchkarov S, Kushmuradov, 1979. Lupinine alkaloids from *Sophora alopecuroids*. *Khim. Prir. Soedin.*, (3): 413 – 414.
Li X M, 1984. Inhibitory effects of sophocarpine on animal tumors. *Acta Pharmacol. Sin.*, 5 (2): 125 – 128. [李雪梅, 1984, 槐果碱对动物肿瘤的抑制作用. 中国药理学报, 5 (2): 125 – 128]
Li Y S, Luo W G, Zhao S H, 1996. Effects of food plants on the aldrin epoxidationase and acetylcholinesterases of the diamondback moth. *Acta Phytophyl. Sin.*, 23 (2): 181 – 184. [李云寿, 罗万春, 赵善欢, 1996. 不同寄主植物对小菜蛾艾氏剂环氧化酶和乙酰胆碱酯酶活性的影响. 植物保护学报, 23 (2): 181 – 184]
Liu G Q, Yuan H N, 1987. Effects of sophcarpine and other alkaloids from *Sophora alopecuroids* L. on monoamine metabolism, and dopamine and 5-H T receptors. *Acta Phytophyl. Sin.*, 22 (9): 645 – 649. [刘国卿, 袁惠南, 1987, 槐果碱等苦豆子生物碱对大鼠单胺代谢及多巴胺和 5-羟色胺受体的作用. 中国药理学报, 22 (9): 645 – 649]
Luo W G, Li Y S, Zhao S H, Mu L Y, 1997. The toxicities of alkaloids from *Sophora alopecuroids* against tumip aphids and effects on several esterases. *Acta Entomol. Sin.*, 40 (4): 357 – 365. [罗万春, 李云寿, 赵善欢, 慕立义, 1997, 苦豆子生物碱对萝卜蚜的毒力及其对几种酯酶的影响, 昆虫学报, 40 (4): 357 – 365]
Metcalf R L, Metcalf E T, 1991. Plant Kairomones in Insect Ecology and Control. New York: Chapman and Hall.
Waller G R, Nowacki E K, 1987. Alkaloids Biology and Metabolism in Plants. New York: Plenum Press.
Zhao B G, Liu X H, 1984. The stored developments of several alkaloids in *Sophora alopecuroids*. *Troditiional Herbs*, 5 (12): 31 – 32. [赵博光, 刘秀华, 1984. 苦豆子中几种生物碱的薄层定量及积累动态. 中草药, 5 (12): 31 – 32]
Zhou L H, 1979. Study on biological characteristics of *Sophora alopecuroids*. *Acta Botan. Sin.*, 21 (4): 380 – 382. [周立华, 1979. 苦豆子 (*Sophora alopecuroids* L.) 生物学特性的研究. 植物学报, 21 (4): 380 – 382]